**Лабораторна робота № 5**

**Виділення нуклеопротеїнів та нуклеїнових кислот із біологічного матеріалу**

*Дослід 1. Виділення рибо- та дезоксирибонуклеопротеїнів з тваринних тканин та дріжджів*

Дезоксирибо- та рибонуклеопротеїни можна виділити з тваринних тканин, використовуючи луги. Якщо розчиняти дезоксирибонуклеопротеїни (ДНП) в лугах, їх можна осадити шляхом нейтралізації, а якщо розчиняти в розчинах солей,

осадження можна здійснити після розведення розчину. Рибонуклеопротеїни, що є також розчинними в лужних розчинах, осаджуються при додаванні неорганічних кислот (оцтової кислоти) в ізоелектричній точці.

*Матеріали та реактиви.* Тканина (зобна залоза, селезінка, молоки риб); сухі дріжджі; 5%-й розчин хлориду натрію, який містить 0,04% тризаміщеного цитрату натрію, 0,2%-й, 0,4%-й і 0,02 моль/л розчини NаОН, 5%-й розчин оцтової кислоти;

фільтри.

*Обладнання.* Фарфорова ступка з товкачиком, скляні палички, центрифужні та звичайні пробірки, лійки, центрифуга.

*Хід роботи.*

Одержання дезоксирибонуклеопротеїнів.

1. 0,5 г селезінки або іншої тканини (зобна залоза, селезінка, молоки риб, сухі дріжджі) подрібнюють у фарфоровій ступці з 100 мг скляного порошку та з 15 мл 5%-го розчину NaCl (який містить 0,04% тризаміщеного цитрату натрію) протягом 15 хв.

2. Суміш переносять у центрифужні пробірки й центрифугують 15 хв за 1000 *g.* У пробірку наливають 90 мл води й повільно доливають центрифугат, перемішуючи вміст скляною паличкою. Дезоксирибонуклеопротеїни, які є нерозчинними у воді, випадають у осад у вигляді ниток. Нитки збирають на паличку або, якщо утвориться осад, фільтрують, переносять у чисту пробірку та розчиняють у 0,2%-му розчині NaOH.

Одержання рибонуклеопротеїнів.

1. Наважку сухих дріжджів (10 г) ретельно розтирають у фарфоровій ступці протягом 15 хв із 50 мл 0,4%-го розчину NaOH, який додають невеликими порціями.

2. Суміш центрифугують 10 хв при 2000 g, до центрифугату доливають, помішуючи, 15—20 мл 5%-го розчину оцтової кислоти. Для відокремлення осаду проби центрифугують, після цього отриманий осад розчиняють у 15—20 мл розчину NaOH (0,02 моль/л). Одержані розчини рибо- та дезоксирибонуклеопротеїнів використовують у якісних реакціях на виявлення їх складових компонентів (азотистих основ, вуглеводів, фосфорної кислоти та білків).

*Дослід 2. Виділення РНК з дріжджів за Шантренном*

РНК можна отримати з різних об’єктів: дріжджів, вірусу тютюнової мозаїки, печінки, підшлункової залози. При виділенні РНК із дріжджів за методом Шантренна проводять лужний гідроліз дріжджів при 0°С. РНК осаджується спиртом у кислому середовищі, а для очищення препарату здійснюють переосадження.

*Матеріали та реактиви*. Пекарські дріжджі, 10%-вий розчин NaOH, оцтова кислота, 94%-й етиловий спирт, концентрована соляна кислота, ефір, 2%-вий розчин NaOH, холодний ацетон.

*Обладнання*. Колби, льодяна баня, полотно для фільтрування, годинник, піпетки, мірний циліндр, центрифужні пробірки, центрифуга, ексикатор.

*Хід роботи.*

1. Наважку пекарських дріжджів суспендують у 4-х об'ємах води і охолоджують до 0°С. Потім додають ще 2 об'єми попередньо охолодженого до 0°С 10%-вого розчину NaOH до кінцевої концентрації лугу 3,3%.

2. Розчин залишають на 1,5 год при 0°С, доводять рН до 6,5 оцтовою кислотою і фільтрують крізь полотно. Отриману прозору рідину, до якої додають етиловий спирт до концентрації 4%, фільтрують. При цьому утворюється прозорий фільтрат

жовтого кольору із зеленуватою флуоресценцією.

3. До фільтрату додають концентровану соляну кислоту до кислої реакції за конго, а потім повільно при перемішуванні додають 4/5 об'єму 94%-го етилового спирту.

4. Розчин відстоюють 30 хв, при цьому утворюється білий осад. Більшу частину рідини зливають, а осад відокремлюють центрифугуванням, промивають двічі спиртом, ефіром і висушують в ексикаторі над сірчаною кислотою. Таким чином отримують рибонуклеїнову кислоту у вигляді білого порошку. Вихід становить 1,2% від ваги взятих для роботи дріжджів.

Даний метод дозволяє одержати нерозчинний препарат РНК. При виникненні необхідності таку РНК можна перевести в натрієву сіль, яка добре розчинна у воді. Для цього беруть певну наважку РНК, суспендують її у 50 об'ємах води і рН розчину доводять 2%-вим розчином NaOH до 6,0. Якщо розчин каламутний, його фільтрують, охолоджуючи до 0°С, і додають 3 об'єми холодного ацетону. При цьому в осад випадає рибонуклеїнат натрію, його центрифугують, промивають ацетоном і висушують в ексикаторі. У такий спосіб препарати РНК, що є в продажу, переводять в натрієву сіль.